

# ANALYSE DES AMINES BIOLOGIQUES PAR LES TECHNIQUES DE CHROMATOÏONOPHORÈSE, ÉLECTROPHORÈSE ET CHROMATOGRAPHIE SUR PAPIER

J. BLASS ET A. SARRAFF

avec la collaboration technique de

MARIE BLANCHE NICOLAS

*Institut Pasteur, Annexe de Garches, Service de Chimie Bactérienne, Garches (France)*

(Reçu le 12 mai 1959)

L'étude présente a été entreprise dans le but de déterminer les amines biologiques produites dans un milieu de culture par action bactérienne.

Dans trois publications antérieures<sup>1-3</sup> l'un de nous a décrit l'application des techniques de chromatoïonophorèse et d'électrophorèse à l'analyse de quelques amines biologiques fixes, présentes dans un mélange à côté d'acides aminés.

Nous avons étendu ces techniques à une série d'amines biologiques fixes ou volatiles pouvant se trouver dans les bouillons de culture.

La technique de chromatoïonophorèse proposée permet l'identification des amines fixes dans le bouillon de culture, après élimination des bases aminées volatiles, sans nécessiter leur extraction préalable. Elle permet également une meilleure résolution d'un mélange d'amines extraites du bouillon, que ne le font la technique simple d'électrophorèse sur papier<sup>4, 5</sup> ou de chromatographie sur papier<sup>6-9</sup> proposées pour leur analyse.

A côté d'amines biologiques fixes nous avons étudié une série d'amines volatiles.

Divers auteurs ont appliqué les procédés de chromatographie et d'électrophorèse sur papier à leur identification<sup>4, 7-13</sup>.

Nous décrivons les procédés qui nous ont permis d'obtenir les meilleurs résultats.

## MATÉRIEL ET MÉTHODES

### *A. Amines biologiques fixes*

Les amines suivantes ont été étudiées (sous forme de chlorures ou sulfates en solution 0.01 M): cadavérine, putrescine, agmatine, histamine, tyramine\* et tryptamine.

L'étude des amines biologiques fixes est effectuée dans le bouillon débarrassé de corps bactériens, après élimination des bases aminées volatiles (voir chapitre Amines volatiles).

---

\* Amines pour lesquelles GALE<sup>14</sup> a isolé les décarboxylases responsables de leur formation à partir des acides  $\alpha$ -aminés correspondants.

Le bouillon privé des bases volatiles est analysé avant et après hydrolyse. Celle-ci est effectuée en présence de HCl 6 N, pendant 24 heures à 110°, en ampoule scellée sous vide. L'hydrolysate est évaporé dans un dessiccateur sous vide, en présence de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> et de KOH en pastilles. On chasse l'acide chlorhydrique en ajoutant un peu d'eau et en évaporant à nouveau, ainsi à trois reprises. On reprend l'hydrolysate par un volume d'eau correspondant au volume initial du bouillon. Le bouillon est soumis avant et après hydrolyse à l'analyse préalable par électrophorèse sur papier, puis par chromatographie ionophorèse. On dépose sur le papier des volumes variables du bouillon, pouvant contenir jusqu'à 500 µg d'azote total (10 à 50 mm<sup>3</sup> dans nos essais).

### *Électrophorèse sur papier*

Nous avons étudié la séparation des bases aminées dans les tampons suivants :

tampon de pH = 8.6:	véronal sodique 10.3 g, véronal acide 1.84 g, eau pour compléter à 1000.
tampon de pH = 4.0 à base de phtalate:	phtalate acide de potassium 0.1 N 100 ml, NaOH 0.1 N 0.8 ml, eau pour compléter à 200.
tampon de pH = 4.0 à base d'acide sulfosalicylique <sup>5</sup> :	acide sulfosalicylique 0.05 M. On amène à pH = 4.0 par addition de soude*.
tampon de pH = 10.0:	ammoniaque 0.065 N (7 ml de NH <sub>3</sub> concentré dans 1 l).
tampon de pH = 11.7**:	ammoniaque N.
tampon de pH = 2.4***:	acide acétique N.

On utilise pour l'électrophorèse des bandes de papier Whatman No. 3. On dépose les solutions à analyser, ainsi que les solutions témoins, sur une ligne distante de 7 cm de la ligne médiane, vers le bord anodique, ces lignes étant perpendiculaires à la marche du courant. On utilise à côté des témoins latéraux, des témoins internes.

L'électrophorèse est pratiquée dans l'appareil de MACHEBOEUF, REBEYROTTE ET DUBERT\*\*\*, sous 400 V, pendant un temps variable, suivant la nature du tampon (2 à 5 h).

Le papier est ensuite séché à l'étuve à 100°. On révèle les amines en trempant les bandes dans une solution de ninhydrine à 0.1 % dans l'acétone<sup>15</sup> et en les séchant pendant quelques minutes à l'étuve à 100°. Dans le cas du tampon pH = 8.6, on ajoute à la solution acétonique de ninhydrine 1 % d'acide acétique (v/v) (solution fraîchement préparée). On peut aussi utiliser une solution de ninhydrine à 0.1 % dans du butanol saturé d'eau, additionnée de 1 % d'acide acétique (solution stable) et opérer par pulvérisation. On obtient des colorations violettes, bleues ou gris-violettes suivant la nature de l'amine.

### *Chromatographie ionophorèse*

Nous utilisons pour la chromatographie ionophorèse une feuille de papier Whatman No. 3<sup>16</sup> de 57 cm × 46.5 cm. On effectue dans la première dimension une chromatographie

\* Ce tampon ne peut pas être utilisé pour le bouillon non hydrolysé.

\*\* Ces deux tampons ne nous ont pas donné de résultats satisfaisants.

\*\*\* Lérés, 9 cité Canrobert, Paris XV°.

descendante, et dans la deuxième dimension une électrophorèse sur papier, le sens du courant étant perpendiculaire au sens d'écoulement du solvant.

On dépose la solution à analyser en O (voir Fig. 1) à 7 cm de la ligne médiane M N, vers le bord qui sera plongé dans le compartiment anodique, et à 11 cm du bord A B. On trace les lignes E F et G H suivant la largeur de l'appareil à électrophorèse qui doit recevoir ces bandes (soit 32 cm largeur maximum K L dans nos essais).

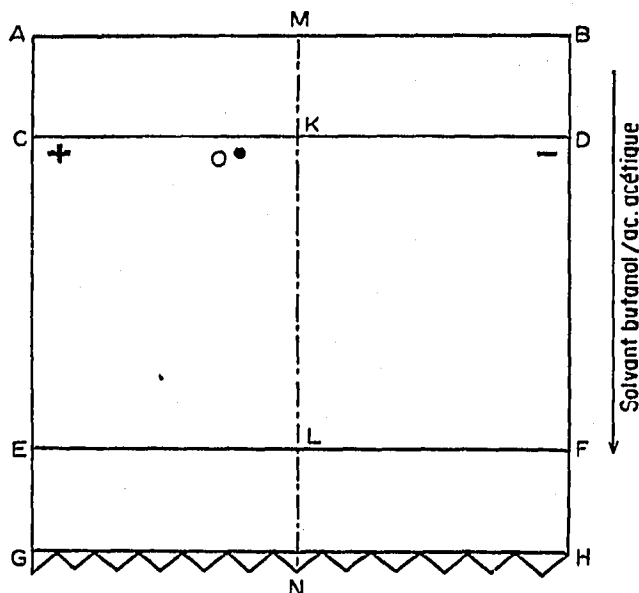


Fig. 1.

Le solvant utilisé pour la chromatographie est le mélange butanol-acide acétique-eau, formule de Woïwod<sup>17\*</sup>.

On laisse migrer le solvant 24 à 32 h. En laissant plus de 24 h, le solvant commence à s'écouler du papier, mais la base la plus rapide, tryptamine ( $R_F = 0.66$ ) ne quitte généralement pas le papier, après 32 h de chromatographie.

Les bandes CDEF et EFGH découpées sont placées dans l'appareil à électrophorèse, en utilisant un des tampons cités plus haut, le tampon pH = 8.6 de préférence. Le papier est mouillé avec la solution tampon en laissant une marge de 4 cm de chaque côté de la position présumée des amino-acides et des bases aminées et on laisse le papier s'imbiber complètement par capillarité. On poursuit l'ionophorèse comme il a été décrit plus haut.

A côté du révélateur général, constitué par la solution de ninhydrine, nous avons utilisé pour quelques amines (histamine, tyramine, tryptamine et agmatine) des révélateurs spécifiques.

Histamine et tyramine:

Réactif de PAULY: acide sulfanilique diazoté, formule de DENT<sup>6</sup>.

Tryptamine:

Réactif d'EHRlich, formule de SMITH<sup>15</sup>.

Agmatine:

Réactif de SAKAGUCHI, formule de ROCHE *et al.*<sup>8</sup> ou formule de JEPSON ET SMITH<sup>18</sup>.

\* Butanol 125 ml, acide acétique 30 ml, eau 125 ml.

*B. Bases aminées volatiles*

Les amines suivantes ont été étudiées (sous forme de chlorhydrates) :

*Amines primaires*: en solution 0.004 *M* (concentration la plus convenable): méthylamine, éthylamine, propylamine, butylamine, isobutylamine, isoamylamine, phényléthylamine et allylamine.

*Amines secondaires*: diméthylamine en solution 0.01 *M*, diéthylamine en solution 0.1 *M* et diisoamylamine en solution 0.04 *M*.

*Amines tertiaires*: triméthylamine en solution 0.2 *M* et triéthylamine en solution 0.02 *M*.

On déposait sur le papier 5 à 10 mm<sup>3</sup> de ces solutions.

Nous utilisons pour la chromatographie du papier Whatman No. 1 ou No. 4, tamponné avec une solution d'acétate de soude 0.8 % et comme solvant le mélange butanol-acide acétique-eau (125:30:125).

On révèle les amines primaires et secondaires avec une solution de ninhydrine à 0.1 %, additionnée de 1 % d'acide acétique (voir plus haut). On sèche à l'étuve à 100° au moins 20 min car les amines secondaires ne se révèlent qu'après un chauffage prolongé. On obtient des colorations violettes, bleues et rouges suivant la nature de l'amine.

Pour la révélation spécifique des amines non saturées on peut utiliser le révélateur proposé par DIHLMANN<sup>10,11</sup>: (solution fraîche à 1 % de  $\beta$ -naphthoquinone sulfonate de soude dans une solution de carbonate de soude à 5 %), on obtient une coloration bleue pour les amines saturées et une coloration jaune-verte pour les amines non saturées.

On révèle les amines tertiaires par immersion avec le réactif de CHARGAFF<sup>10,20</sup> (1. acide phosphomolybdique à 2 %, lavage avec du butanol pendant 5 min, puis avec eau courante pendant 5 min, 2. solution de SnCl<sub>2</sub> à 0.4 % dans HCl 3 *N*). Les amines tertiaires donnent des taches bleu-foncé sur un fond bleu-clair.

Pour identifier les bases aminées volatiles présentes dans le bouillon de culture, on distille le bouillon débarrassé de corps microbiens, après alcalinisation à pH = 8.0<sup>21</sup>. Le distillat est recueilli dans un récipient refroidi à 0°, puis neutralisé avec acide sulfurique sans excès, et convenablement concentré par distillation sous vide. On ramène le volume du bouillon privé de bases volatiles à sa valeur initiale par addition d'eau distillée.

## RÉSULTATS

*A. Bases aminées fixes**(a) Chromatographie sur papier*

Le Tableau I indique les  $R_F$ \* des bases aminées étudiées, chromatographiées dans le solvant butanol-acide acétique, sur papier Whatman No. 3, les limites de sensibilité de leur réaction avec la solution de ninhydrine ainsi qu'avec les révélateurs spécifiques.

\* Remarquons que les  $R_F$  dans le solvant butanol-acide acétique sont légèrement variables d'une chromatographie à l'autre.

TABLEAU I

Base aminée	$R_F$	Révélateur à la ninhydrine, limite de sensibilité en $\mu\text{g}$	Révélateurs spécifiques, limite de sensibilité en $\mu\text{g}$
Agmatine	0.18	0.2	0.5
Cadavérine	0.15	0.4	
Histamine	0.15	1.0	0.25
Putrescine	0.12	0.4	
Tryptamine	0.66	1.5	0.5
Tyramine	0.61	1.5	2.0
Ethanolamine	0.32	0.1	
Glucosamine	0.20	0.25	0.5*

\* On utilise pour la révélation de la glucosamine les réactifs de ELSON ET MORGAN, formule de PARTRIDGE ET WESTALL<sup>22</sup>.

A titre de comparaison nous avons porté sur le même tableau les caractéristiques des deux amines suivantes: éthanolamine et glucosamine.

Voici les  $R_F$  de quelques amino-acides déposés sur le même chromatogramme que les amines du Tableau I: lysine 0.13, arginine 0.17, alanine 0.32, tyrosine 0.43, phénylalanine 0.58 et leucines 0.61.

On voit que la chromatographie simple ne permet pas d'identifier les bases aminées en présence d'amino-acides. Elle ne permet pas non plus, en absence d'amino-acides, la résolution complète d'un mélange des bases aminées.

### (b) Électrophorèse sur papier

Le Tableau II indique les chemins parcourus en cm par les bases aminées, à partir de la ligne de départ, au cours de l'électrophorèse dans divers tampons, sur papier Whatman No. 3.

A titre de comparaison nous avons fait figurer dans ce tableau les deux amines

TABLEAU II

Base aminée	Tampon pH = 8.6 durée 2½ h	Tampon pH = 4.0 "acide sulfosalicylique" durée 2½ h	Tampon pH = 4.0 "phthalate" durée 2 h	Tampon pH = 10.0 durée 3 h
Agmatine	22.5	15.4	16.0	15.2
Cadavérine	23.5	17.2	17.6	15.0
Histamine	16.0	16.2	17.1	9.0
Putrescine	24.3	18.7	18.9	12.6
Tryptamine	12.6	11.4	8.9	8.8
Tyramine	14.4	12.3	10.2	6.0
Ethanolamine	20.8	17.9	16.5	8.5
Glucosamine	9.0	12.7	8.5	3.9
Arginine	12.4	11.4	8.3	5.4
Lysine	13.4	12.4	10.2	4.7

suivantes: glucosamine et éthanolamine, ainsi que les acides aminés basiques: lysine et arginine.

On voit d'après ce tableau que l'électrophorèse simple peut servir de recherche préalable pour l'analyse des amines en présence d'acides aminés car dans la plupart des tampons essayés, quelques bases aminées se déplacent plus loin que les amino-acides basiques (lysine et arginine).

L'électrophorèse seule ne permet pas cependant la résolution complète d'un mélange des bases aminées.

Notons que les chiffres indiqués pour le cheminement des bases aminées ont un caractère purement indicatif, ils ne sont valables que pour les solutions pures et les concentrations données. En présence d'un grand excès d'autres substances, les vitesses de cheminement des bases sont considérablement ralenties. La comparaison avec des témoins latéraux n'est donc pas suffisante.

Lorsqu'on cherche à identifier les bases contenues dans un volume de bouillon pouvant contenir jusqu'à 500  $\mu\text{g}$  d'azote total, on dépose sur le papier, côte à côte, le bouillon seul et le bouillon additionné de divers témoins, car *seul l'emploi des témoins internes se confondant avec les taches correspondant au mélange analysé est valable pour leur identification.*

### (c) Chromatoïonophorèse sur papier

Nous donnons dans la Fig. 2 le schéma de la séparation d'un mélange d'acides aminés et de bases aminées obtenue par la technique décrite plus haut, en utilisant pour l'électrophorèse le tampon pH = 8,6.

On voit sur le schéma que toutes les bases aminées analysées sont séparées entre elles et suffisamment séparées des amino-acides basiques et neutres.

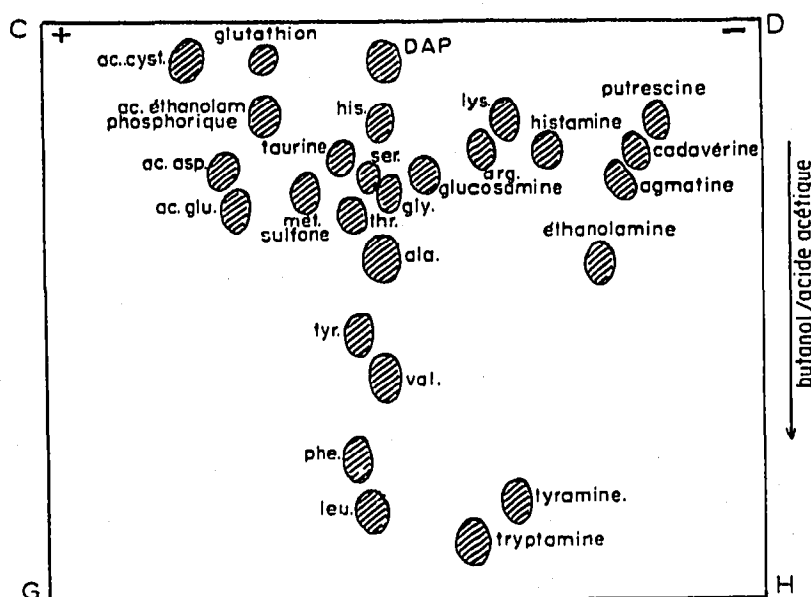


Fig. 2.

*B. Amines volatiles**I. Amines primaires et secondaires*

(a) *Chromatographie sur papier (Whatman No. 1) tamponné.* On trouve dans le Tableau III les  $R_F$  des diverses amines étudiées, chromatographiées dans le solvant butanol-acide acétique. Les concentrations utilisées étaient indiquées dans le chapitre Méthodes.

Nous indiquons également la limite de sensibilité de la réaction avec la ninhydrine, ainsi que la teinte de la coloration obtenue.

TABLEAU III

<i>Amine</i>	$R_F$	<i>Révélateur à la ninhydrine, limite de sensibilité en <math>\mu\text{g}</math></i>	<i>Coloration avec la ninhydrine</i>
Méthylamine	0.40	0.15	rouge-violette
Éthylamine	0.55	0.10	violette
Propylamine	0.64	0.15	violette
Isobutylamine	0.76	0.2	violette
Butylamine	0.79	0.35	violette
Isoamylamine	0.86	0.10	violette
Phényléthylamine	0.84	0.5	bleue
Allylamine	0.61	0.6	bleue
Diméthylamine	0.45	0.2	rosée
Diéthylamine	0.66	18	rosée
Diisoamylamine	0.95	30	rosée

On voit sur le Tableau III que trois groupes d'amines saturées suivantes ont des  $R_F$  rapprochés et ne se séparent pas bien lorsqu'elles se trouvent mélangées: méthylamine et diméthylamine, butylamine et isobutylamine, propylamine et diéthylamine.

Nous avons réussi à séparer ces amines entre elles en utilisant une bande de papier de 80 cm (papier au mètre), tamponné avec acétate de soude 0.8% et en laissant la chromatographie se poursuivre pendant 40 h (système descendant, à écoulement libre).

(b) *Électrophorèse sur papier.* Le Tableau IV indique les chemins parcourus en cm par les amines étudiées dans le tampon à  $\text{pH} = 4.0$  (à base de phtalate) sur papier Whatman No. 1. L'électrophorèse a été poursuivie pendant 1½ h.

TABLEAU IV

<i>Amine</i>	<i>Chemin parcouru en cm</i>
Méthylamine	19.5
Éthylamine	14.5
Propylamine	12.4
Butylamine	11.2
Isobutylamine	11.2
Isoamylamine	10.2
Allylamine	13.0
Diméthylamine	15.5
Diéthylamine	11.6
Phényléthylamine	8.5

On voit que l'électrophorèse réalise une assez bonne séparation entre ces amines (sauf pour butylamine et isobutylamine).

## 2. Amines tertiaires

(a) *Chromatographie sur papier*. Les  $R_F$  de deux amines tertiaires étudiées, chromatographiées dans les mêmes conditions que les amines primaires et secondaires, étaient: 0.29 pour triméthylamine et 0.70 pour triéthylamine.

(b) *Électrophorèse sur papier*. Le Tableau V indique les chemins parcourus en cm par ces deux amines dans le tampon de pH = 4.0, à base de phtalate, sur papier Whatman No. 1, ainsi que la limite de sensibilité avec le révélateur de CHARGAFF.

L'électrophorèse a été poursuivie pendant 1 ½ h.

A titre de comparaison nous indiquons sur le même tableau les résultats obtenus dans les mêmes conditions pour les bases quaternaires: choline et neurine pour lesquelles on utilise le même révélateur.

TABLEAU V

Amine	Chemin parcouru en cm	Révélateur de CHARGAFF, limite de sensibilité en µg
Triméthylamine	16.0	60.0
Triéthylamine	11.7	9.0
Neurine	14.6	2.5
Choline	13.4	10.0

Notons que la sensibilité de la révélation est plus grande pour les taches obtenues sur électrophorégrammes que pour celles correspondantes sur chromatogrammes car les premières sont moins étalées par rapport aux secondes. Pour l'identification des bases aminées tertiaires l'utilisation de l'électrophorèse est donc préférable à la chromatographie.

## DISCUSSION

BLOCK *et al.*<sup>23</sup> ont décrit une méthode d'extraction des amines d'un mélange complexe à l'aide d'éther, dans un appareil à extraction continue liquide-liquide. Cette méthode comporte plusieurs opérations, elle est de longue durée et se prête mal à des essais en série.

La méthode de chromatophorèse proposée, appliquée à l'analyse des amines biologiques fixes dans le bouillon de culture, débarrassé de corps bactériens et privé d'amines volatiles, permet l'identification des amines fixes en présence d'autres substances ninhydrine-positives, sans nécessiter leur extraction préalable. Si l'on utilise cependant pour l'analyse le bouillon non hydrolysé, on risque de confondre des peptides basiques éventuellement présents avec des amines. Une comparaison entre les résultats obtenus pour le bouillon, avant et après hydrolyse acide, permet d'éliminer les taches correspondant aux peptides basiques:



Nous avons contrôlé que seule la tryptamine est détruite au cours de l'hydrolyse acide, toutes les autres amines étudiées sont quantitativement retrouvées.

Cette méthode facilite les analyses en série, grâce à sa simplicité et à sa rapidité. Elle permet de déceler jusqu'à 0.2 à 2  $\mu\text{g}$  d'amine individuelle (suivant la nature de l'amine), dans un volume de bouillon pouvant contenir 500  $\mu\text{g}$  d'azote au maximum.

Divers autres auteurs ont proposé des techniques combinées de chromatographie et d'électrophorèse sur papier, appliquées à l'analyse des amino-acides, en utilisant l'électrophorèse en première direction (avec un tampon volatil) et la chromatographie en seconde direction<sup>24-26</sup>.

Dans notre cas particulier nous avons préféré le procédé inverse que nous avons déjà proposé en 1954<sup>2</sup> pour les raisons suivantes:

Le chemin parcouru par les bases, au cours d'une électrophorèse, est considérablement ralenti lorsqu'on dépose sur papier une grande quantité de substances accessoires. En soumettant à l'électrophorèse un mélange déjà séparé, par chromatographie sur papier, en plusieurs fractions, on évite en grande partie cet inconvénient.

Parmi les divers procédés proposés pour la chromatographie sur papier des amines volatiles, c'est celui de STEINER et coll.<sup>12</sup>, utilisant des papiers tamponnés à l'acétate de soude d'après MUNIER<sup>27</sup> qui nous a donné les meilleurs résultats.

Si l'on utilise des papiers non tamponnés, on obtient pour les amines des taches avec front irrégulier quelque soit la formule du solvant utilisé ce qui rend la méthode moins sensible et contribue à une moins bonne séparation.

Seul l'emploi des papiers tamponnés à l'acétate de soude avec le solvant butanol-acide acétique nous a permis d'obtenir des taches bien rondes et d'augmenter ainsi la sensibilité de la révélation avec la ninhydrine. (Nous avons légèrement modifié le procédé de STEINER en utilisant, pour tamponner le papier, une solution d'acétate de soude à 0.8 % au lieu de 0.2%.)

La sensibilité de la révélation des amines primaires et secondaires a été encore accrue par l'addition de 1 % d'acide acétique à la solution de ninhydrine à 0.1 ou 0.2 % (dans l'acétone ou butanol). Les amines secondaires, en concentration convenable, sont bien révélées, en utilisant cette formule de révélateur, à condition de chauffer au moins 20 min à 100°. Dans les mêmes conditions le révélateur proposé par DAVIES *et al.*<sup>13</sup> (ninhydrine à 0.2 % dans isopropanol, additionné de 20 % de pyridine) ne donne aucune coloration avec les amines secondaires. Le révélateur de CHARGAFF proposé par STEINER et coll.<sup>12</sup> se prête mieux à la révélation des amines tertiaires que les vapeurs d'iode proposées par DIHLMANN<sup>11</sup> d'après BRANTE<sup>28</sup>.

#### RÉSUMÉ

Nous décrivons une méthode de chromatophorèse permettant la recherche des amines biologiques fixes, dans un bouillon débarrassé de corps microbiens, après séparation des amines volatiles et ne nécessitant pas leur extraction préalable.

Des quantités de l'ordre de quelques  $\mu\text{g}$  d'amines présentes dans un volume de bouillon pouvant contenir jusqu'à 500  $\mu\text{g}$  d'azote, peuvent ainsi être décelées.

Nous décrivons un procédé de chromatographie sur papier des amines volatiles primaires, secondaires et tertiaires, utilisant des papiers tamponnés, ainsi qu'un procédé d'électrophorèse sur papier, et nous indiquons la limite de sensibilité de leur révélation.

## SUMMARY

A chromato-ionophoretic method is described by means of which non-volatile biological amines produced in broth culture can be studied after removal of bacterial substances and separation of volatile amines. Preliminary extraction of the non-volatile amines is not necessary.

Quantities of amines of the order of a few  $\mu\text{g}$  present in a volume of broth containing up to 500  $\mu\text{g}$  of nitrogen, can be detected by this method.

A paper-chromatographic method using buffered papers and a paper-electrophoretic method are described for the detection of volatile primary, secondary and tertiary amines. The detection limits of these amines are given.

## BIBLIOGRAPHIE

- <sup>1</sup> J. BLASS, M. MACHEBOEUF ET P. REBEYROTTE, *Bull. soc. chim. biol.*, 35 (1953) 953.
- <sup>2</sup> J. BLASS, O. LECOMTE ET J. POLONOWSKI, *Bull. soc. chim. biol.*, 36 (1954) 627.
- <sup>3</sup> J. BLASS, *Bull. soc. chim. biol.*, 38 (1956) 1305.
- <sup>4</sup> R. WEBER, *Helv. Chim. Acta*, 34 (1951) 2034.
- <sup>5</sup> E. J. HERBST, D. L. KEISTER ET R. H. WEAVER, *Arch. Biochem. Biophys.*, 75 (1958) 175.
- <sup>6</sup> C. E. DENT, *Biochem. J.*, 43 (1948) 169.
- <sup>7</sup> J. M. BREMNER ET R. H. KENTEN, *Biochem. J.*, 49 (1951) 651.
- <sup>8</sup> J. ROCHE, W. FELIX, I. ROBIN ET NGUYEN VAN THOAI, *Compt. rend.*, 233 (1951) 1688.
- <sup>9</sup> R. SCHWYZER, *Acta Chem. Scand.*, 6 (1952) 219.
- <sup>10</sup> W. DIHLMANN, *Naturwissenschaften*, 40 (1953) 342.
- <sup>11</sup> W. DIHLMANN, *Biochem. Z.*, 325 (1954) 295.
- <sup>12</sup> M. STEINER ET E. STEIN VON KAMIENSKI, *Naturwissenschaften*, 40 (1953) 483.
- <sup>13</sup> D. F. DAVIES, K. M. WOLF ET M. PERRY, *J. Lab. Clin. Med.*, 41 (1955) 802.
- <sup>14</sup> E. F. GALE, *Advances in Enzymol.*, 6 (1946) 1.
- <sup>15</sup> I. SMITH, *Nature*, 171 (1953) 43.
- <sup>16</sup> J. BLASS, *Bull. soc. chim. biol.*, 40 (1958) 1003.
- <sup>17</sup> A. J. WOIWOD, *J. Gen. Microbiol.*, 3 (1949) 312.
- <sup>18</sup> J. B. JEPSON ET I. SMITH, *Nature*, 172 (1953) 1100.
- <sup>19</sup> E. CHARGAFF, C. LEVINE ET C. GREEN, *J. Biol. Chem.*, 175 (1948) 67.
- <sup>20</sup> C. LEVINE ET E. CHARGAFF, *J. Biol. Chem.*, 192 (1951) 465.
- <sup>21</sup> F. LEBERT ET P. TARDIEU, *Technique d'isolement et de détermination des bactéries anaérobies*, Pacomhy Editeurs, Paris, 1952.
- <sup>22</sup> S. M. PARTRIDGE ET R. G. WESTALL, *Biochem. J.*, 42 (1948) 238.
- <sup>23</sup> R. J. BLOCK, E. L. DURRUM ET G. ZWEIG, *A Manual of Paper Chromatography and Paper Electrophoresis*, Academic Press, New York, 1955, p. 122.
- <sup>24</sup> B. KICKHÖFEN ET O. WESTPHAL, *Z. Naturforsch.*, 7b (1952) 659.
- <sup>25</sup> C. G. HONEGGER, *Helv. Chim. Acta*, 40 (1957) 847.
- <sup>26</sup> G. BISERTE, P. BOULANGER ET P. PAYSANT, *Bull. soc. chim. biol.*, 40 (1958) 2067.
- <sup>27</sup> R. MUNIER, *Bull. soc. chim. biol.*, 34 (1952) 204.
- <sup>28</sup> G. BRANTE, *Nature*, 163 (1949) 651.